

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 10 月 20 日 (20.10.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/098012 A1

(51) 国際特許分類: C12P 7/24, 19/02

Haruhiko [JP/JP]; 〒7708506 徳島県徳島市南常三島町 2 丁目 1 番地 徳島大学内 Tokushima (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/005719

(22) 国際出願日: 2005 年 3 月 28 日 (28.03.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2004-095263 2004 年 3 月 29 日 (29.03.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三井化学株式会社 (MITSUI CHEMICALS, INC.) [JP/JP]; 〒1057117 東京都港区東新橋一丁目 5 番 2 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 松本 和也 (MATSUMOTO, Kazuya) [JP/JP]; 〒2970017 千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内 Chiba (JP). 数野 康 (KAZUNO, Yasushi) [JP/JP]; 〒2970017 千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内 Chiba (JP). 東村 紀一 (HIGASHIMURA, Norikazu) [JP/JP]; 〒2970017 千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内 Chiba (JP). 大島 敏久 (OHSHIMA, Toshihisa) [JP/JP]; 〒7708506 徳島県徳島市南常三島町 2 丁目 1 番地 徳島大学内 Tokushima (JP). 櫻庭 春彦 (SAKURABA,

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCTION OF CHIRAL HYDROXYALDEHYDES

(54) 発明の名称: キラルなヒドロキシアルデヒド化合物の製造方法

(57) Abstract: An industrial process for producing hydroxyaldehydes efficiently, which solves the problems of conventional DERA, e.g., low stability to aldehydes, low catalytic activity for aldol condensation, and uncontrollableness in the number of condensed acetaldehyde molecules. According to the process, aldol condensation of a substituted or unsubstituted aliphatic aldehyde having 2 to 6 carbon atoms with acetaldehyde is conducted by use of D-2-deoxyribose 5-phosphate aldolase which has high catalytic activity for aldol condensation and is highly stable to aldehydes, whereby a hydroxyaldehyde having a number of carbon atoms increased by two or four can be produced.

(57) 要約: 従来の DERA の問題点であった、アルデヒドに対する安定性が低い、アルドール縮合の触媒活性が低い、及び縮合するアセトアルデヒド数を制御できないという問題を解決し、ヒドロキシアルデヒド類を効率よく製造する工業的方法を提供する。アルデヒドに対し安定性が高く、かつアルドール縮合の触媒活性が高い D-2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼを用いて、炭素数 2 から 6 の置換または無置換の脂肪族アルデヒド化合物とアセトアルデヒドとをアルドール縮合反応させることにより、炭素数が 2 または 4 増加したヒドロキシアルデヒド化合物を製造する。

WO 2005/098012 A1

明 細 書

キラルなヒドロキシアルデヒド化合物の製造方法

技術分野

- [0001] 本発明は、炭素数が2から6の置換または無置換の脂肪族アルデヒド化合物に対し、アセトアルデヒドを1分子アルドール縮合する、もしくはさらに2分子目のアセトアルデヒドをアルドール縮合することで、炭素数が2または4増加したヒドロキシアルデヒド化合物を製造する方法に関するものである。

背景技術

- [0002] D-2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼ (EC4. 1. 2. 4) (以下、「DERA」と略記する。)は、グリセルアルデヒド-3-リン酸とアセトアルデヒドを基質とし、D-2-デオキシリボース-5-リン酸を合成するアルドール縮合およびその逆反応(レトアルドール反応)を触媒する酵素の総称である。大腸菌由来のDERAについては、その反応性が詳細に解析されており、比較的広い基質特異性を持ち、種々のアルデヒドのアルドール縮合を触媒し、キラルなヒドロキシアルデヒドを生成することが報告されている(非特許文献1を参照。)。
- [0003] 図1に示した反応スキームのように、種々のアルデヒドとアセトアルデヒドのアルドール縮合では、1分子のアセトアルデヒドがアルドール縮合したヒドロキシアルデヒドに、さらにもう1分子のアセトアルデヒドがアルドール縮合し、炭素数が4増加した化合物が得られることが報告されている。この際2分子のアセトアルデヒドがアルドール縮合した化合物は、安定なラクトール構造をとるために、主反応生成物として生成すると報告されている(非特許文献2を参照。)。
- [0004] しかし、従来知られているDERAによる上述のような種々のアルデヒドに対する活性は、本来の基質であるグリセルアルデヒド-3-リン酸とアセトアルデヒドの場合に比べ極端に低く100分の1未満と報告されている(非特許文献3を参照。)。また、アルデヒド類は酵素に対して強力な阻害剤であり、DERAもアルデヒドによる阻害を受けることが報告されている。(非特許文献4を参照。)。したがって、これらアルデヒドのアルドール縮合を行うには大量の酵素が必要となる。例えば、前記の特許文献1には、4-

置換-3-ヒドロキシブチルアルデヒド中間体を経由する、2, 4, 6-トリデオキシヘキソース誘導体の合成が記載されているが、基質であるアセトアルデヒドと置換アセトアルデヒドとの合計モル数に対し、D-2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼを約125 U～150 U/mmolという高用量で実施されている。同様に、アセトアルデヒドを1分子縮合させることを目的とする反応においても、約80 U～100 U/mmolという高用量で加える必要があるとされている。さらには、阻害を緩和する目的から、アルデヒドとDERAを数回に分けて分割添加するなどの方法も検討されている(特許文献2を参照。)。

[0005] DERAによるアルドール縮合反応のもうひとつの問題は、縮合するアセトアルデヒドの分子数を制御することが困難であるということである。アルドール縮合に供する2種のアルデヒドの濃度比を変える、または、酵素量を変えるなどの方法で試みられてはいるが、 α 位または β 位にヒドロキシ基があるいくつかのアルデヒドとアセトアルデヒドのアルドール縮合の場合を除いては制御が困難であった(非特許文献5、非特許文献6及び特許文献3を参照。)。このような問題から、DERAによるアルドール縮合反応は実用化することが困難であった。

[0006] 安定性の高いDERAという観点では、超好熱菌アエロパイラム・ペルニックス(*Aeropyrum pernix*)由来の耐熱性DERAが報告されている(特許文献4を参照。)。この酵素は、耐熱性が高いことと、メタノールやエタノール等の極性有機溶媒に対する安定性が高いことが報告されている(非特許文献8を参照。)。そのほかにも、サーモトガ・マリティマ(*Thermotoga maritima*)、サーマス・サーモフィラス(*Thermus thermophilus*)などの好熱性菌由来DERAが報告されているが、これら好熱性菌由来DERAのアルデヒドに対する安定性や、それらのアルドール縮合の活性などについては一切報告されていない(非特許文献9を参照。)。

[0007] 一般的に好熱性菌由来酵素は、本来の生育温度付近である高温領域において高い活性を示し、常温領域では著しく活性が低い。アルデヒドのような反応性の高い化合物を基質とするアルドール縮合の場合、高温領域での反応では様々な副反応を起こしてしまうことが予想される。それゆえ、アルドール反応を低温条件で実施する必要があり、好熱性菌由来DERAを利用することは一般的には考えにくいことである。

また、アルデヒドがタンパク質中のリジン残基などと反応する性質を持つことから、単に熱安定性が高いという理由から、アルデヒドに対する安定性も高いと推察することは困難であった。

特許文献1: 米国特許5, 795, 749号公報

特許文献2: WO 03/006656

特許文献3: WO03/077868

特許文献4: 特開2003-250553号

非特許文献1: J. Am. Chem. Soc. vol. 112, pp. 2013-2014 (1990)

非特許文献2: J. Am. Chem. Soc. vol. 116, pp. 8422-8423 (1994)

非特許文献3: J. Am. Chem. Soc. vol. 114, pp. 741-748 (1992)

非特許文献4: PNAS. Vol. 101, pp. 5788-5793 (2004)

非特許文献5: J. Am. Chem. Soc. vol. 117, pp. 3333-3339 (1995)

非特許文献6: Angew. Chem. Int. Ed. vol. 39, pp. 1352-1374 (2000)

非特許文献7: J. Am. Chem. Soc. vol. 114, pp. 741-748 (1992)

非特許文献8: J. Biol. Chem. vol. 278, pp. 10799-10806 (2003)

非特許文献9: J. Mol. Biol. vol. 343, pp. 1019-1034 (2004)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0008] 本発明は、従来のDERAの問題点であった、アルデヒドに対する安定性が低い、アルドール縮合の触媒活性が低い、及び縮合するアセトアルデヒド数を制御できないという問題を解決し、ヒドロキシアルデヒド類を効率よく製造する工業的方法を提供することを目的としている。

課題を解決するための手段

- [0009] 本発明者らは、アルデヒドに対し安定性が高く、かつアルドール縮合の触媒活性が高い、DERAを鋭意探索した。その結果、超好熱性菌サーモトガ・マリティマ (*Thermotoga maritima*) 由来、及びパイロバキュラム・アエロフィラム (*Pyrobaculum aerophilum*) 由来のDERAが、アルデヒドに対する安定性が著しく高いことを見出した。また、天然の基質であるグリセルアルデヒド-3-リン酸とアセトアルデヒドに対する2

5°Cでの活性は既存の大腸菌由来の酵素に対し著しく低いが、非天然基質であるアルデヒドとアセトアルデヒドに対するアルドール縮合反応の活性は、既に報告されている大腸菌由来DERAよりはるかに高いことを見出した。さらに、超好熱性菌パイロバキュラム・アエロフィラム(*Pyrobaculum aerophilum*)由来DERAにおいては、1分子のアセトアルデヒドがアルドール縮合した β -ヒドロキシアルデヒドに、さらにもう1分子のアセトアルデヒドがアルドール縮合する反応が起こりにくく、炭素数が2増加した β -ヒドロキシアルデヒドが優先的に得られるという特徴があることを見出し、本発明を完成するに至った。

- [0010] サーモトoga・マリティマ(*Thermotoga maritima*)及びパイロバキュラム・アエロフィラム(*Pyrobaculum aerophilum*)については、ゲノム情報がすでに公開されており(Nature, vol. 399, pp. 323-329(1999)、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. vol. 99 pp. 984-989(2002))、これらの情報を基に大腸菌由来DERAとの相同性から両菌株のDERAをコードしていると思われるDNA配列が推定されていた。しかしながら、これら超好熱性菌由来DERAについての詳細解析はなされておらず、本発明以前にこれらDERAにこのような効果があるとは想定することもできなかった。このように本発明は、種々のアルドール縮合反応への応用性が未知であった超好熱性菌由来DERAの効果について初めて実証し、明らかにしたものである。

- [0011] 即ち、本発明は、

[1] 100mMのクロロアセトアルデヒドを含有する水媒体中、25°Cで30分間処理した後の残存活性が50%以上であるD-2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼの存在下、炭素数が2から6の置換または無置換の脂肪族アルデヒド化合物と1分子のアセトアルデヒドをアルドール縮合反応させる、炭素数が2増加したヒドロキシアルデヒド化合物の製造方法、

[2] 100mMのクロロアセトアルデヒドを含有する水媒体中、25°Cで30分間処理した後の残存活性が50%以上であるD-2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼ(または該酵素を含む細胞またはその処理物)の存在下、炭素数が2から6の置換または無置換の脂肪族アルデヒド化合物と2分子のアセトアルデヒドをアルドール縮合反応

させる、炭素数が4増加したヒドロキシアルデヒド化合物の製造方法、
に関するものである。

発明の効果

- [0012] 本発明によれば、アルデヒドに対し安定性が高く、かつアルドール縮合の触媒活性が高いDERAを用いることにより、少ない酵素量で反応器当りの生産性を向上させることができる。また、アセトアルデヒドを1分子アルドール縮合する活性の高いDERAと、アセトアルデヒドを2分子アルドール縮合する活性の高いDERAを使い分けることで、所望のヒドロキシアルデヒド化合物を高収率で得ることが可能となる。

図面の簡単な説明

- [0013] [図1]DERAによる逐次アルドール反応 (Sequential aldol reactions catalyzed by DERA) の概要を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

- [0014] 100mMのクロロアセトアルデヒドを含有する水媒体中、25℃で30分間処理した後の残存活性は、本発明に用いられるDERAの好適なpHに設定された100mMの緩衝成分と100mMのクロロアセトアルデヒドを含む水溶液に、適当量のDERAを溶解し25℃で30分間処理したあと、100mMになるようアセトアルデヒドを添加し25℃で2時間アルドール縮合反応を行い、生成した4-クロロ-3-ヒドロキシブチルアルデヒドと6-クロロ-2, 4, 6-トリデオキシヘキソースの生成量の合計値及び該処理をせずにアルドール縮合反応を行った場合の、4-クロロ-3-ヒドロキシブチルアルデヒド及び6-クロロ-2, 4, 6-トリデオキシヘキソースの生成量の合計値を求め、後者の値に対する前者の値の割合と定義される。なお、本明細書において、100mMのクロロアセトアルデヒドを含有する水媒体中、25℃で30分間処理した後の残存活性の評価を、単に「クロロアセトアルデヒド耐性の評価」といい、100mMのクロロアセトアルデヒドを含有する水媒体中、25℃で30分間処理した後の残存活性の値を「クロロアセトアルデヒド耐性値」と略記することもある。
- [0015] 本発明に用いられるDERAの活性は、25℃で1分間当たり1 μ molのD-2-デオキシリボース-5-リン酸をD-グリセルアルデヒド-3-リン酸とアセトアルデヒドに分解する酵素量を1Uと定義される。D-2-デオキシリボース-5-リン酸の分解によって生じるD

ーグリセルアルデヒド-3-リン酸は、トリオースリン酸イソメラーゼでジヒドロキシアセトンリン酸に変換し、これをグリセロール-3-リン酸脱水素酵素で反応させた際のNADH(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド還元型)の減少量により定量する。

- [0016] 本発明において用いられるDERAは、上記の100mMのクロロアセトアルデヒドを含有する水媒体中、25℃で30分間処理した後の残存活性が、50%以上の残存活性値を示すDERAであれば何ら制限は受けない。このようなDERAとして、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するDERAまたは配列番号2に示されるアミノ酸配列を有するDERAが好適なものとして挙げられる。
- [0017] 配列番号1に示すアミノ酸配列を有するDERAは、例えば、ジャパン コレクション オブ マイクロオーガニズムズ (Japan Collection of Microorganisms (JCM)) から入手できるサーモトガ・マリティマ (JCM番号10099) より得られる。配列番号1に示すアミノ酸配列は、本発明に見られる効果が保持されている限りにおいて、配列番号1に示すアミノ酸配列の1ないし数個のアミノ酸が欠失、または他のアミノ酸残基に置換され、或いは他のアミノ酸残基が挿入されるといった変異が導入された配列であっても良い。
- [0018] 配列番号2に示すアミノ酸配列を有するDERAは、例えば、JCMから入手できるパイロバキュラム・アエロフィラム (JCM番号9630) より得られる。配列番号2に示すアミノ酸配列は、本発明に見られる効果が保持されている限りにおいて、配列番号2に示すアミノ酸配列の1ないし数個のアミノ酸が欠失、または他のアミノ酸残基に置換され、或いは他のアミノ酸残基が挿入されるといった変異が導入された配列であっても良い。
- [0019] 近年の分子生物学および遺伝子工学の進歩により、前記のDERA遺伝子および発現に必要な制御領域が挿入された組換えプラスミドを構築し、これを任意の宿主に導入し、該蛋白質を発現させた遺伝子組換え菌を作出することが可能となり、かつ、比較的容易にもなった。かかる技術水準に鑑み、このようなDERAの遺伝子を任意の宿主に導入した遺伝子組換え菌も本発明のDERAを発現している微生物に包含されるものとする。ここでいう発現に必要な制御領域とは、プロモーター配列(転写を制御するオペレーター配列を含む)・リボゾーム結合配列(SD配列)・転写終結配列

等を示している。プロモーター配列の具体例としては、大腸菌由来のトリプトファンオペロンのtrpプロモーター・ラクトースオペロンのlacプロモーター・ラムダファージ由来のPLプロモーター及びPRプロモーターや、枯草菌由来のグルコン酸合成酵素プロモーター(gnt)・アルカリプロテアーゼプロモーター(apr)・中性プロテアーゼプロモーター(npr)・ α -アミラーゼプロモーター(amy)等が挙げられる。また、tacプロモーターのように独自に改変・設計された配列も利用できる。リボゾーム結合配列としては、大腸菌由来または枯草菌由来の配列が挙げられるが、大腸菌や枯草菌等の所望の宿主内で機能する配列であれば特に限定されるものではない。たとえば、16SリボゾームRNAの3'末端領域に相補的な配列が4塩基以上連続したコンセンサス配列をDNA合成により作成してこれを利用してもよい。転写終結配列は必ずしも必要ではないが、 ρ 因子非依存性のもの、例えばリポプロテインターミネーター・trpオペロンターミネーター等が利用できる。これら制御領域の組換えプラスミド上での配列順序は、5'末端側上流からプロモーター配列、リボゾーム結合配列、DERAをコードする遺伝子、転写終結配列の順に並ぶことが望ましい。ここでいうプラスミドの具体例としては、大腸菌中での自律複製可能な領域を有しているpBR322、pUC18、Blue script

II SK(+), pKK223-3, pSC101, pET15b (Novagen社製)等や、枯草菌中での自律複製可能な領域を有しているpUB110, pTZ4, pC194, ρ 11, ϕ 1, ϕ 105等をベクターとして利用することができる。また、2種類以上の宿主内での自律複製が可能なプラスミドの例として、pHV14, TRp7, YEp7及びpBS7をベクターとして利用することができる。ここでいう任意の宿主には、後述の実施例のように大腸菌BL21 [DE3]株 (Novagen社製) などの大腸菌(*Escherichia coli*)が代表例として挙げられるが、とくに大腸菌に限定されるものではなく枯草菌(*Bacillus subtilis*)等のバチルス属菌、酵母や放線菌等の他の微生物菌株も含まれる。

[0020] 形質転換等、遺伝子組換えの手法に関しては、Molecular Cloning, A laboratory manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等に記載されている方法に準じて行う

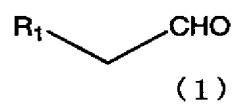
ことができる。形質転換された組換え細胞は、適切な条件下で培養し、その培養物から公知の精製方法によりDERAを調製することができる。

[0021] 100mMのクロロアセトアルデヒドを含有する水媒体中、25℃で30分間処理した後の残存活性が50%以上であるD-2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼの存在下、炭素数が2から6の置換または無置換の脂肪族アルデヒド化合物と1分子のアセトアルデヒドをアルドール縮合反応させることにより、炭素数が2増加したヒドロキシアルデヒド化合物を製造することができる。このアルドール縮合反応は、通常、水溶液中で実施される。反応にあたっては、最適なpHを維持する目的で、適切な緩衝成分を加えてもよいし、酸またはアルカリにより適宜pH調整をしても良い。また、反応を阻害しない程度に、水と混和する有機溶媒、または水と混和しない有機溶媒を加えて反応を行っても良い。

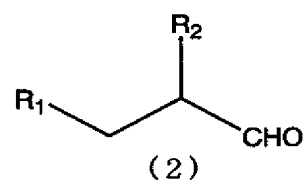
[0022] 炭素数が2から6の置換または無置換の脂肪族アルデヒド化合物における炭素数が2から6の置換の脂肪族アルデヒド化合物は、炭素数が2から6の無置換の脂肪族アルデヒド化合物に結合する任意の位置の水素原子(ただし、アルデヒド基の水素原子を除く)が置換基で置換されている化合物である。このような置換基としては、アルドール縮合反応に悪影響を与えないものであれば特に限定されないが、例えば、ハロゲン原子、アジド基、カルボキシル基、アルコキシ基またはアルカン酸基などが挙げられる。

[0023] 炭素数が2から6の置換または無置換の脂肪族アルデヒド化合物としては、例えば、一般式(1)、一般式(2)または一般式(3)で示される化合物が挙げられる。これら脂肪族アルデヒド化合物に対し、アセトアルデヒドを1分子アルドール縮合することで、それぞれに対応する一般式(4)、一般式(5)または一般式(6)で示される化合物が合成される。また、一般式(1)で示される化合物に対し、アセトアルデヒドを2分子アルドール縮合することで、一般式(7)で示される3-5-ヒドロキシアルデヒド化合物が合成される。尚、一般式(1)～(7)中のR1は、水素原子、水酸基、ハロゲン原子、アジド基、カルボキシル基、または炭素数が1から4のアルコキシ基から選択される。R2は、水素原子、水酸基またはメチル基から選択される。また、R3は、水素原子または水酸基から選択される。

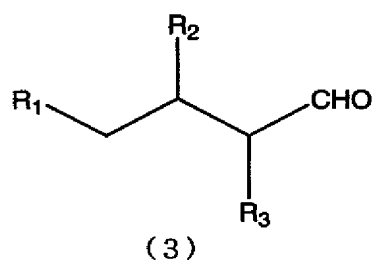
[0024] [化1]



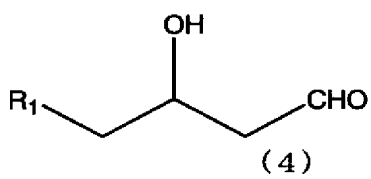
[0025] [化2]



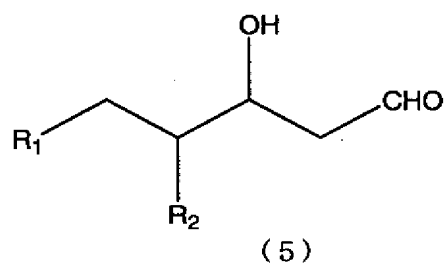
[0026] [化3]



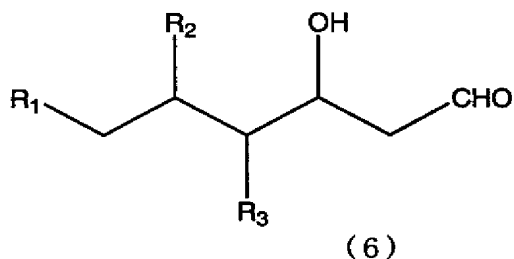
[0027] [化4]



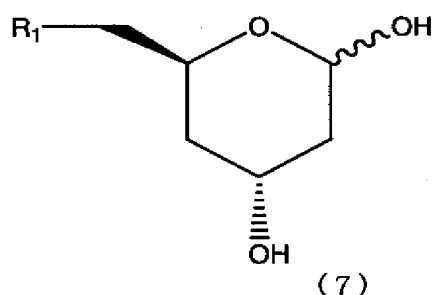
[0028] [化5]



[0029] [化6]



[0030] [化7]



[0031] 一般式(2)で示される化合物としては、アセトアルデヒド、クロロアセトアルデヒド、グリコールアルデヒド、プロピオンアルデヒド、ブチルアルデヒド、イソブチルアルデヒド、3, 4-ジヒドロキシブチルアルデヒド、マロン酸セミアルデヒド、コハク酸セミアルデヒド、アジピン酸セミアルデヒドなどが例示できる。特にクロロアセトアルデヒドは本発明の効果が顕著に現れるが故に好適に使用される。クロロアセトアルデヒドに対し、アセトアルデヒドを1分子アルドール縮合することで、炭素数が2増加した4-クロロ-3-ヒドロキシブチルアルデヒドが合成され、さらに2分子目のアセトアルデヒドを連続してアルドール縮合することで、炭素数が4増加した6-クロロ-2, 4, 6-トリデオキシヘキソースが合成される。一般式(3)で示される化合物では、代表的なものとしてD-グリセルアルデヒド、イソブチルアルデヒドなどが例示できる。一般式(4)で示される化合物としては例えばD-エリトース、3-4-ジヒドロキシブチルアルデヒドが例示できる。

[0032] 一般式(1)、一般式(2)または一般式(3)で示される化合物に対する、アセトアルデヒドの仕込みモル量は、0.5モル等量以上3.0モル等量以内の範囲で設定するのが好適である。例えば、クロロアセトアルデヒドに対し、アセトアルデヒドを1分子アルドール縮合させて、4-クロロ-3-ヒドロキシブチルアルデヒドを合成する場合、クロロアセ

トアルデヒドに対するアセトアルデヒドの仕込みモル量は、通常0.5モル等量以上1モル等量の間で選択される。より好ましくは、パイロバキュラム・アエロフィラム由来DERAのようなアセトアルデヒドを2分子アルドール縮合する活性が低いDERAを用いれば、クロロアセトアルデヒドに対するアセトアルデヒドの仕込みモル量を、0.5モル等量以上3モル等量以内に設定すれば、収率よく4-クロロ-3-ヒドロキシブチルアルデヒドを合成することができる。

[0033] また、クロロアセトアルデヒドに対し、アセトアルデヒドを2分子アルドール縮合させて、6-クロロ-2, 4, 6-トリデオキシヘキソースを合成する場合、クロロアセトアルデヒドに対するアセトアルデヒドの仕込みモル量は、通常2モル等量以上3モル等量の間で選択される。サーモトーガ・マリティマ由来DERAのようなアセトアルデヒドを2分子アルドール縮合する活性が高いDERAを用いれば、収率よく6-クロロ-2, 4, 6-トリデオキシヘキソースを合成することができるのでより好ましい。

[0034] 前記の反応に用いられるDERAの使用量は以下の範囲で規定される。アセトアルデヒドを1分子アルドール縮合することで、3-ヒドロシアルデヒドを合成する場合、一般式(1)、一般式(2)または一般式(3)で示されるアルデヒド化合物とアセトアルデヒドの合計モル数に対し、DERAを0.1U/mmol以上80U/mmol以下の割合で加え反応させることができる。

[0035] アセトアルデヒドを2分子アルドール縮合することで、3-5-ジヒドロシアルデヒドを合成する場合、一般式(1)で示される化合物とアセトアルデヒドの合計モル数に対し、DERAを0.1U/mmol以上120U/mmol以下の割合で加え反応させることができる。

[0036] 前記の反応におけるpH範囲、反応温度は、目的生成物の収率等を考慮して適宜最適な条件を選択すればよい。例えば、反応液のpH範囲は、好ましくはpH4～12、さらに好ましくはpH5～9である。これらの範囲の緩衝液を調製するに際しては、十分な緩衝作用を有する任意のpH緩衝剤が利用できる。反応温度は0℃から100℃の範囲内で選択可能であるが、好ましくは、0℃から40℃の範囲、より好ましくは0℃から25℃の範囲である。

[0037] 反応に要する時間は目的生成物の収率が最も高くなるよう設定すればよい。目的生

成物は反応液より、抽出、共沸蒸留、または晶析などの公知の精製方法により分離、回収することができる。

[0038] 以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものではない。

実施例 1

[0039] サーモトーガ・マリティマ由来DERAの調製

[1] サーモトーガ・マリティマ染色体DNAの調製

サーモトーガ・マリティマの培養には、JCM237培地(以下のように調製する。5. 0g 可溶性デンプン、0. 5g KH_2PO_4 、15. 0ml

添加ミネラル液(蒸留水1lあたり、1. 5g Nitrilotriacetic acid、3. 0g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0. 5g

$\text{MnSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ 、1. 0g NaCl、0. 1g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0. 1g

$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0. 1g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0. 01g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0. 01g

$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ 、0. 01g H_3BO_3 、0. 01g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を組成とし、まずNitrilotriacetic

acidを溶解しKOHによりpHを6. 5に調製した後、残りのミネラルを添加して、pH7.

0に調製したミネラル液)、2. 0mg $\text{NiCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、20. 0g

NaCl、0. 5g Bacto yeast extract (Difco社製)、1. 0mg Resazurin、0. 5g $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 、250ml

人工海水(蒸留水1lあたりに27. 7g NaCl、7. 0g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、5. 5g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0. 65g

KCl、0. 1g NaBr、30. 0mg H_3BO_3 、15. 0mg $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、10. 0mg

Citric acid、0. 05mg KI、2. 25g $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ を溶解した組成液)、蒸留水 750 mlの組成物で、 $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ を除く組成物を混合しpHを H_2SO_4 により6. 5に調製

する。窒素雰囲気下でフィルター濾過により無菌化する。5%溶液として $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$

を中和し、窒素雰囲気下で高圧滅菌(121℃、20分間)する。植菌前に、殺菌した $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ を添加し、必要に応じてpHを6. 5に調製する。)を用いた。保存菌株(JC

M番号10099)を、脱気後、窒素通気により嫌気条件を維持しながら、80℃で、24

から96時間、マグネチックスターラーにより攪はん培養し、2Lの培養液を調製した。培養終了後、得られた培養液中の菌体を遠心分離(5000g、10分間)により集菌し、3%

NaClで洗菌を行った。菌体湿重量2gの菌体を8mlのTE緩衝液(10mM Tris-HCl(pH7.5)、1mM EDTA)に懸濁した。この菌体懸濁液に10mg/ml

Lysozyme溶液2ml、10mg/ml RNase溶液 100 μ lを加え37°Cで、30分間インキュベーションした後、20mg/ml Proteinase K溶液50 μ lを加え、10分後、30mg/ml

N-Lauroylsarcosine Na溶液 1mlを加えて、さらに45分間インキュベーションした。当量のCI(クロロホルム:イソアミルアルコール=24:1)を加え穏やかに混和し、遠心分離(7000g、15分間)して、水層を分取した。同じ操作をもう一度繰り返した後に、PCI(水平衡化フェノール:CI=1:1)処理をCI処理と同様に2回繰り返した。さらに2回CI処理した後、0.1倍量の3M

酢酸ナトリウムを加えて攪拌し、当量のイソプロパノールを加えて軽く攪拌した。析出したDNAをディスポチューブで巻き取り、70%エタノールで、洗浄し乾燥させ、TE緩衝液

500 μ lに溶解することにより、サーモトガ・マリティマ染色体DNAを得た。

[0040] [2]サーモトガ・マリティマDERA遺伝子のクローニング、及び、該DERAを発現する大腸菌株の調製

サーモトガ・マリティマ染色体DNAを鋳型とし、配列番号3及び配列番号4に記載の配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いたPCRにより、配列番号1のサーモトガ・マリティマ由来DERA遺伝子を含むDNA断片を得た。得られたDNA断片を、制限酵素NdeI、BamHIを用いて処理し、同じくNdeI、BamHIを用いて処理した市販の発現ベクターpET15b(Novagen社製)にライゲーションすることにより、サーモトガ・マリティマ由来DERA発現プラスミドpET15b-TM1559を得た。この発現プラスミドを用いて大腸菌BL21[DE3]株(Novagen社製)を形質転換し、サーモトガ・マリティマ由来DERAを発現する大腸菌株BL21[DE3]/pET15b-TM1559を得た。

[0041] [3]組換え大腸菌からのサーモトーガ・マリティマ由来DERAの精製

組換え大腸菌株BL21[DE3]／pET15b-TM1559は、50 μ g/mlアンピシリンを含むSB(1L中、トリプトン 12g、酵母エキス 24g、グリセロール 5ml、 K_2HPO_4 12.5g、 KH_2PO_4 3.8g)培地100mlに植菌し、37℃で、 $OD_{660} = 0.6$ になるまで培養した後、終濃度が1mMになるようにIPTG(イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド)を加え、さらに3時間培養した。培養終了後、遠心分離(5000g 10分間)により、集菌し、0.85% NaCl溶液で、洗菌し、湿菌体重量の9倍量の10 mM Tris-HCl(pH7.5)緩衝液に懸濁させ、超音波破碎後、遠心分離し、上清を粗酵素液とした。粗酵素液を80℃で、10分間熱処理し、遠心分離により熱変性した不溶性蛋白質を除去した。ニッケルを配位させた金属アフィニティーカラム(Hi Trap affinity columns (Pharmacia Biotech社製))に、0.5M NaCl、10mM イミダゾールを含む10mM Tris-HCl(pH7.5)緩衝液で、平衡化した後、熱処理後の不溶性蛋白質を除去した粗酵素液を吸着させ、イミダゾール濃度を0.1M、0.2M、0.3M、0.4M、0.5Mと段階的に上昇させて、活性画分を回収した。こうして得られたサーモトーガ・マリティマ由来DERAの純度をSDS-PAGEにて分析し、均一に精製されていることを確認した。またその蛋白質量は、Bio-Rad Protein Assayキット(Bio-Rad社製)を用いて定量した。

実施例 2

[0042] パイロバキュラム・アエロフィラム由来DERAの調製

パイロバキュラム・アエロフィラムの培養は、JCM215培地(以下に調製法をしめす。1 25ml 海洋培地／合成海水混合液(47.15g NaCl, 18.10g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 、7.0g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、3.13g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、3.24g Na_2SO_4 、0.1g Na_2CO_3 、0.1g NaBr、80.0mg KBr、72.0mg $SrCl_2 \cdot 6H_2O$ 、52.0mg H_3BO_3 、8.1mg Na_2HPO_4 、2.4mg NaF、0.4mg Sodium silicate、0.05mg KIを1lの蒸留水に溶解した溶液)、10.0ml 添加ミネラル液(蒸留水1lあたり、1.5g Nitrilotriacetic acid、3.0g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.5g $MnSO_4 \cdot xH_2O$ 、1.0g

NaCl、0. 1g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0. 1g $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0. 1g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0. 01g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0. 01g $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ 、0. 01g H_3BO_3 、0. 01g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を組成とし、まずNitrilotriacetic acidを溶解しKOHによりpHを6. 5に調製した後、残りのミネラルを添加して、pH7. 0に調製したミネラル液)、2. 0mg $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0. 25g NH_4Cl 、2. 0mg $(\text{NH}_4)_2\text{Ni}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0. 1mg Na_2SeO_4 、0. 1mg $\text{NaWO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、2. 2g NaHCO_3 、0. 07g KH_2PO_4 、0. 5g Bacto yeast extract (Difco社製)、1. 0g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、86 5. 0mlの蒸留水を混合溶解し、1N H_2SO_4 でpHを7. 0に調整後、フィルター濾過により滅菌した。窒素・二酸化炭素・酸素の混合比が80:20:1の組成の気体雰囲気下で培地を培養器に入れた。)を用い植菌後200kPaに加圧して、95℃で培養した。パイロバキュラム・アエロフィラム染色体DNAは、保存菌株(JCM番号9630)より実施例1と同様の方法で調製した。パイロバキュラム・アエロフィラム染色体DNAを鋳型とし、配列番号5及び配列番号6に記載の配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いたPCRにより、配列番号2のパイロバキュラム・アエロフィラム由来DERA遺伝子を含むDNA断片を得た。パイロバキュラム・アエロフィラム由来DERA遺伝子の開始コドンGTGは大腸菌での発現のためATGに変更した。配列番号2には変更後のDNA配列を示している。

- [0043] 得られたDNA断片を、制限酵素NdeI、BamHIを用いて処理し、同じくNdeI、BamHIを用いて処理した市販の発現ベクターpET15bにライゲーションすることにより、パイロバキュラム・アエロフィラム由来DERA発現プラスミドpET15b-PAE1231を得た。この発現プラスミドを用いて大腸菌BL21[DE3]株を形質転換し、パイロバキュラム・アエロフィラム由来DERA発現大腸菌株BL21[DE3]/pET15b-PAE1231を得た。
- [0044] 組換え大腸菌株BL21[DE3]/pET15b-PAE1231からのパイロバキュラム・アエロフィラム由来DERAの精製は実施例1の[3]に記載の方法と同様の方法に従った。
- [0045] [参考例1] 大腸菌由来DERAの精製

アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American type culture collection (ATCC)) から入手できる大腸菌 W3110 (ATCC 番号 27325) 培養菌体より、実施例 1 と同様の方法で調製した大腸菌染色体 DNA を鋳型とし、配列番号 7 及び配列番号 8 に記載の配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いた PCR により、大腸菌由来 DERA 遺伝子を含む DNA 断片を得た。この大腸菌由来 DERA 遺伝子を含む DNA 断片を、制限酵素 NdeI、BamHI を用いて処理し、同じく NdeI、BamHI を用いて処理した市販の発現ベクター pET11b (Novagen 社製) にライゲーションすることにより、大腸菌由来 DERA 発現プラスミド pET11b-DERA を得た。この発現プラスミドを用いて大腸菌 BL21 [DE3] 株を形質転換し、大腸菌由来 DERA 発現大腸菌株 BL21 [DE3] / pET11b-DERA を得た。組換え大腸菌から実施例 1 の方法に従って粗酵素液を調製し、硫安沈殿 (50~70% 飽和濃度) での分画後、50mM Tris-HCl (pH 7.5) 緩衝液に透析した。この粗酵素液を、Phenyl 5PW 疎水クロマトグラフィー (東ソー製) にかけて、1~0M 硫安を含む 50mM Tris-HCl (pH 7.5) 緩衝液の直線濃度勾配にて溶出し、得られた活性画分を SDS-PAGE にて分析し、大腸菌由来 DERA が均一に精製されていることを確認した。蛋白質量は、Bio-Rad Protein Assay キットを用いて定量した。

実施例 3

[0046] D-2-デオキシリボース-5-リン酸分解活性の比較

実施例 1 で得られたサーモトーガ・マリティマ由来 DERA、実施例 2 で得られたパイロバキュラム・アエロフィラム由来 DERA、及び、参考例 1 で得られた大腸菌由来 DERA の 25℃ での D-2-デオキシリボース-5-リン酸分解活性を測定した。測定は生成した D-グリセルアルデヒド-3-リン酸をトリオースリン酸イソメラーゼでジヒドロキシアセトンリン酸に変換し、これをグリセロール-3-リン酸脱水素酵素で反応させた際の NADH の減少を測定することで行った。

[0047] 1ml の活性測定液 (50mM トリエタノールアミン-HCl (pH 7.5)、0.5mM D-2-デオキシリボース-5-リン酸、3.9U トリオースリン酸イソメラーゼ (SIGMA 社製)、11U

グリセロール-3-リン酸脱水素酵素 (SIGMA 社製)、0.12mM NADH、及び、測定

対象の活性画分)のうち、D-2-デオキシリボース-5-リン酸、トリオースリン酸イソメラーゼ、グリセロール-3-リン酸脱水素酵素、NADHを除く組成を25℃で3分間保温し、その後残りの組成を加えた。25℃で保温しながら吸光度を測定できる分光光度計を用いて、340nmの吸光度の減少を1分間測定した。DERAの活性1単位(U)は、25℃で1分間当たり1 μ molのNADHを減少させる酵素量と定義した。また、NADHの340nmにおけるモル吸光係数は6.22mM⁻¹cm⁻¹とした。このようにして測定した、サーモトガ・マリティマ由来DERA、パイロバキュラム・アエロフィラム由来DERA及び大腸菌由来DERAの25℃における1mgあたりの酵素活性(U)を表1に示す。

[0048] [表1]

表 1

酵素	酵素活性
サーモトガ・マリティマ由来DERA	0.58 U
パイロバキュラム・アエロフィラム由来DERA	0.10 U
大腸菌由来DERA	61.1 U

実施例 4

[0049] クロロアセトアルデヒド耐性の評価

サーモトガ・マリティマ由来DERA250 μ gを、100mMのクロロアセトアルデヒドを含む100mM クエン酸-クエン酸Na緩衝液(pH6.5)中に溶解し、25℃で30分間保温した。保温後、100mMになるようアセトアルデヒドを添加し25℃で2時間アルドール縮合反応を行った。対照区として、サーモトガ・マリティマ由来DERA250 μ gを、100mMのクロロアセトアルデヒドを含む100mM クエン酸-クエン酸Na緩衝液(pH6.5)中に溶解し、100mMになるようアセトアルデヒドを添加し25℃で2時間アルドール縮合反応を行った。反応液をULTRAFREE-MCフィルター(Millipore社製)で濾過して除蛋白することで反応を停止し、HPLC分析により、生成した4-クロロ-3-ヒドロキシブチルアルデヒドと6-クロロ-2,4,6-トリデオキシヘキソースを定量した。対照区の、4-クロロ-3-ヒドロキシブチルアルデヒド及び6-クロロ-2,4,6-トリデオキシヘキソースの生成量合計に対する、処理区の生

成量合計の割合を算出した。

- [0050] 同様に、パイロバキュラム・アエロフィラム由来DERA250 μ gを、100mMのクロロアセトアルデヒドを含む100mM 酢酸-酢酸Na緩衝液 (pH5. 5) 中に溶解し、25℃で30分間保温した。保温後、100mMになるようアセトアルデヒドを添加し25℃で2時間アルドール縮合反応を行った。対照区として、パイロバキュラム・アエロフィラム由来DERA250 μ gを、100mMのクロロアセトアルデヒドを含む100mM 酢酸-酢酸Na緩衝液 (pH5. 5) 中に溶解し、100mMになるようアセトアルデヒドを添加し25℃で2時間アルドール縮合反応を行った。反応液をULTRAFREE-MCフィルター (Millipore社製) で濾過して除蛋白することで反応を停止し、HPLC分析により、生成した4-クロロ-3-ヒドロキシブチルアルデヒドと6-クロロ-2, 4, 6-トリデオキシヘキソースを定量した。対照区の、4-クロロ-3-ヒドロキシブチルアルデヒド及び6-クロロ-2, 4, 6-トリデオキシヘキソースの生成量合計に対する、処理区の生成量合計の割合を算出した。
- [0051] 同様に、大腸菌由来DERA250 μ gを、100mMのクロロアセトアルデヒドを含む100mM Tris-HCl緩衝液 (pH7. 5) 中に溶解し、25℃で30分間保温した。保温後、100mMになるようアセトアルデヒドを添加し25℃で2時間アルドール縮合反応を行った。対照区として、パイロバキュラム・アエロフィラム由来DERA250 μ gを、100mMのクロロアセトアルデヒドを含む100mM Tris-HCl緩衝液 (pH7. 5) 中に溶解し、100mMになるようアセトアルデヒドを添加し25℃で2時間アルドール縮合反応を行った。反応液をULTRAFREE-MCフィルター (Millipore社製) で濾過して除蛋白することで反応を停止し、HPLC分析により、生成した4-クロロ-3-ヒドロキシブチルアルデヒドと6-クロロ-2, 4, 6-トリデオキシヘキソースを定量した。対照区の、4-クロロ-3-ヒドロキシブチルアルデヒド及び6-クロロ-2, 4, 6-トリデオキシヘキソースの生成量合計に対する、処理区の生成量合計の割合を算出した。
- [0052] サーモトーガ・マリティマ由来DERA、パイロバキュラム・アエロフィラム由来DERA、及び、大腸菌由来DERAの4-クロロ-3-ヒドロキシブチルアルデヒドによるクロロアセトアルデヒド耐性の評価結果を表2に示す。

[0053] 4-クロロ-3-ヒドロキシブチルアルデヒド、6-クロロ-2, 4, 6-トリデオキシヘキソースの高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による定量法

HPLCカラムとして、Develosil RPAQUEOUSカラム(野村化学製)を使用し、カラム温度40℃で、水を溶離液として分析した。アプライ量は、20 μ Lで、RI検出器(日本分光製)を用い検出を行った。

[0054] [表2]

表2

酵素	クロロアセトアルデヒド耐性値 (%)
サーモトーガ・マリティマ由来DERA	133
パイロバキュラム・アエロフィラム由来DERA	98
大腸菌由来DERA	15

実施例 5

[0055] サーモトーガ・マリティマ由来DERAによるクロロアセトアルデヒドとアセトアルデヒドのアルドール縮合

サーモトーガ・マリティマ由来DERA 400 μ g (0.23U)を、100mM クエン酸-クエン酸Na緩衝液 (pH6. 5)、300mM アセトアルデヒド、100mM

クロロアセトアルデヒドの組成からなる反応液1mlに添加し、25℃で24時間反応を行った。反応液をULTRAFREE-MCフィルター (Millipore社製) で濾過し除蛋白した後に、HPLCを用いて4-クロロ-3-ヒドロキシブチルアルデヒドと6-クロロ-2, 4, 6-トリデオキシヘキソースの生成量合計を定量した。生成量合計から求めたクロロアセトアルデヒドの転化率は95%であった。また、6-クロロ-2, 4, 6-トリデオキシヘキソースの生成量から求めたクロロアセトアルデヒドの転化率は90%であった。反応液を、2倍容の酢酸エチルで抽出する操作を3回行い、3回分の酢酸エチル相を合わせて減圧濃縮した。濃縮物を少量の酢酸エチルで溶解し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにアプライした。酢酸エチル:ヘキサン=9:1の溶離液で溶離し、4-クロロ-3-ヒドロキシブチルアルデヒドと6-クロロ-2, 4, 6-トリデオキシヘキソース画分を分画した。各々のカラム分取物を¹H

NMR、¹³C NMR分析し、特許文献1、非特許文献2での報告と合致することを確認した。

実施例 6

[0056] パイロバキュラム・アエロフィラム由来DERAによるクロロアセトアルデヒドとアセトアルデヒドのアルドール縮合

パイロバキュラム・アエロフィラム由来DERA 400 μ g (0.04U)を、100mM 酢酸-酢酸Na緩衝液 (pH5.5)、300mM アセトアルデヒド、100mM

クロロアセトアルデヒドの組成からなる反応液1mlに添加し、25℃にて24時間反応させた。反応液をULTRAFREE-MCフィルター (Millipore社製)で濾過し除蛋白した後に、HPLCを用いて4-クロロ-3-ヒドロキシブチルアルデヒドと6-クロロ-2, 4, 6-トリデオキシヘキソースの生成量合計を定量した。生成量合計から求めたクロロアセトアルデヒドの転化率は93%であった。また、6-クロロ-2, 4, 6-トリデオキシヘキソースの生成量から求めたクロロアセトアルデヒドの転化率は50%であった。反応液を、2倍容の酢酸エチルで抽出する操作を3回行い、3回分の酢酸エチル相を合わせて減圧濃縮した。濃縮物を少量の酢酸エチルで溶解し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにアプライした。酢酸エチル:ヘキサン=9:1の溶離液で溶離し、4-クロロ-3-ヒドロキシブチルアルデヒドと6-クロロ-2, 4, 6-トリデオキシヘキソース画分を分画した。各々のカラム分取物を¹H

NMR、¹³C NMR分析し、特許文献1、非特許文献2での報告と合致することを確認した。

[0057] [参考例2] 大腸菌由来DERAによるクロロアセトアルデヒドとアセトアルデヒドのアルドール縮合

大腸菌由来DERA 400 μ g (24.4U)を、100mM Tris-HCl緩衝液 (pH7.5)を、300mM アセトアルデヒド (純正化学)、100mM クロロアセトアルデヒド (東京化成製)の組成からなる反応液1mlに添加し、25℃にて24時間反応させた。反応液をULTRAFREE-MCフィルター (Millipore社製)で濾過し除蛋白した後に、HPLCを用いて4-クロロ-3-ヒドロキシブチルアルデヒドと6-クロロ-2, 4, 6-トリデオキシヘキソースの生成量合計を定量した。生成量合計から求めたクロロアセトアルデヒドの転化率は4%であった。

実施例 7

[0058] クロロアセトアルデヒドにアセトアルデヒドを1分子アルドール縮合して4-クロロ-3-ヒドロキシブチルアルデヒドを合成する方法

パイロバキュラム・アエロフィラム由来DERA 400 μ g (0.04U)を、100mM 酢酸-酢酸Na緩衝液 (pH5.5)、100mM アセトアルデヒド、100mM クロロアセトアルデヒドの組成からなる反応液1mlに添加し、4℃にて2時間反応させた。反応液をULTRAFREE-MCフィルター (Millipore社製)で濾過し除蛋白した後、HPLCを用いて4-クロロ-3-ヒドロキシブチルアルデヒドと6-クロロ-2,4,6-トリデオキシヘキソースの生成量合計を定量した。生成量合計から求めたクロロアセトアルデヒドの転化率は90%であった。また、4-クロロ-3-ヒドロキシブチルアルデヒドの生成量から求めたクロロアセトアルデヒドの転化率は80%であった。反応液を、2倍容の酢酸エチルで抽出する操作を3回繰り返し、酢酸エチル層を合わせ減圧下、酢酸エチルを蒸発させた。得られた油状物を少量の酢酸エチルに溶解し、シリカゲルクロマトグラフィーにかけ、酢酸エチル:n-ヘキサン(9:1)を溶出液として、4-クロロ-3-ヒドロキシブチルアルデヒドを単離した。単離した、4-クロロ-3-ヒドロキシブチルアルデヒドを¹H NMR、¹³C NMR分析し、非特許文献2の報告と合致することを確認し、4-クロロ-3-ヒドロキシブチルアルデヒドであることを確認した。さらに、HPLC分析により光学純度が97.8%eeであることを確認した。

[0059] HPLCによる光学純度分析

反応液を、4℃に冷却し10%水酸化ナトリウム水溶液によりpH9.0に調整した後、水素化ホウ酸ナトリウムを添加し、30分間攪拌した。反応液を2N塩酸でpH6.0に調整し、残存する水素化ホウ酸ナトリウムを分解した。その後、2倍容の酢酸エチルで抽出する操作を3回繰り返し、酢酸エチル層を合わせ減圧下、酢酸エチルを蒸発させた。得られた油状物を少量のn-ヘキサン:エタノール(50:50)に溶解しHPLCで分析した。HPLCカラムとして、CHIRALPAK AD-H カラム(ダイセル化学(社)製)を使用し、カラム温度40℃で、n-ヘキサン:エタノール(92.5:7.5)を溶離液として分析した。アプライ量は、10 μ Lで、RI検出器(日本分光製)を用い検出を行った

実施例 8

- [0060] サーモトーガ・マリティマ由来DERAによる各種脂肪族アルデヒドとアセトアルデヒドのアルドール縮合

サーモトーガ・マリティマ由来DERA 400 μ g (0.23U)を、100mM クエン酸-クエン酸Na緩衝液(pH6.5)、100mM アセトアルデヒド、100mM 各種脂肪族アルデヒド(プロピオンアルデヒド、ブチルアルデヒド、n-バレルアルデヒド、イソブチルアルデヒド、アジピン酸セミアルデヒドメチルエステル、コハク酸セミアルデヒド)の組成からなる反応液1mlに添加し、25℃にて反応させた。

- [0061] 反応液をULTRAFREE-MCフィルター(Millipore社製)を用いた濾過処理により除蛋白した後に、薄層クロマトグラフィー(TLC)分析にかけ、生じたスポットにより各種脂肪族アルデヒドとアセトアルデヒドとのアルドール縮合反応化合物を検出した。反応に供した脂肪族アルデヒドのすべてについて、アセトアルデヒドとのアルドール縮合化合物が検出された。

TLC分析条件

シリカゲルプレート:シリカ ゲル 60(メルク社製)

展開液:酢酸エチル:n-ヘキサン=9:1

スポット量:反応液 1 μ l

検出方法:12モリブド(6価)リン酸n水和物(和光純薬工業(株)社製)をエタノールにより7%溶液とし、サンプルを展開したシリカゲルプレートを浸漬し加熱して発色させた。

実施例 9

- [0062] パイロバキュラム・アエロフィラム由来DERAによる各種脂肪族アルデヒドとアセトアルデヒドのアルドール縮合

パイロバキュラム・アエロフィラム由来DERA 400 μ g (0.04U)を、100mM 酢酸-酢酸Na緩衝液(pH5.5)、100mM アセトアルデヒド、100mM 各種脂肪族アルデヒド(プロピオンアルデヒド、ブチルアルデヒド、n-バレルアルデヒド、イソブチルアルデヒド、アジピン酸セミアルデヒドメチルエステル、コハク酸セミアルデヒド)の組成からなる反応液1mlに添加し、25℃にて反応させた。

- [0063] 反応液をULTRAFREE-MCフィルター(Millipore社製)を用いた濾過処理により

除蛋白した後に、薄層クロマトグラフィー (TLC) 分析にかけ生じたスポットにより各種脂肪族アルデヒドとアセトアルデヒドとのアルドール縮合反応化合物を検出した。

- [0064] 反応に供した脂肪族アルデヒドのすべてについて、アセトアルデヒドとのアルドール縮合化合物が検出された。

TLC分析条件

シリカゲルプレート:シリカ ゲル 60(メルク社製)

展開液:酢酸エチル:n-ヘキサン=9:1

スポット量:反応液 1 μ l

検出方法:12モリブド(6価)リン酸n水和物(和光純薬工業(株)社製)をエタノールにより7%溶液とし、サンプルを展開したシリカゲルプレートを浸漬し加熱して発色させた。

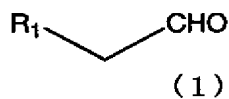
産業上の利用可能性

- [0065] 本発明の製造方法に用いられる超好熱性菌等に由来するDERAは、非天然基質を用いたアルドール縮合反応の触媒活性が高く、また、高い基質濃度でも酵素の安定性が高いため、本発明の製造方法は、従来の大腸菌由来DERAを用いた方法と比較して、反応容器当りのキラルなヒドロキシアルデヒド化合物の生産性を向上させることができる。

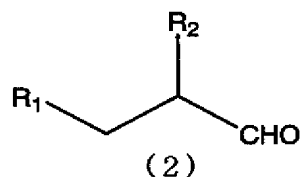
請求の範囲

- [1] 100mMのクロロアセトアルデヒドを含有する水媒体中、25℃で30分間処理した後の残存活性が50%以上であるD-2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼの存在下、炭素数が2から6の置換または無置換の脂肪族アルデヒド化合物と1分子のアセトアルデヒドをアルドール縮合反応させる、炭素数が2増加したヒドロキシアルデヒド化合物の製造方法。
- [2] 請求項1記載のD-2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼが下記の(1)または(2)のものである、請求項1記載の製造方法。
- (1) 配列番号1または配列番号2に示されたアミノ酸配列を有する。
- (2) 配列番号1または配列番号2記載のアミノ酸配列の、1ないし数個のアミノ酸が欠失、または他のアミノ酸残基に置換され、或いは他のアミノ酸残基が挿入されたアミノ酸配列を有する。
- [3] 炭素数が2から6の置換または無置換の脂肪族アルデヒド化合物が一般式(1)、一般式(2)または一般式(3)で示される化合物であり、アルドール縮合反応させて得られる、対応する炭素数が2増加したアルデヒド化合物がそれぞれ一般式(4)、一般式(5)または一般式(6)で示されるアルデヒド化合物である、請求項2記載の製造方法(一般式(1)～一般式(6)中、R1は水素原子、水酸基、ハロゲン原子、アジド基、カルボキシル基、炭素数が1から4のアルキル基、アルコキシ基またはアルカン酸基を示し、R2は水素原子、水酸基またはメチル基を示し、R3は水素原子または水酸基を示す。)。

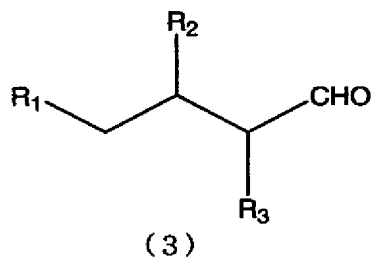
[化1]



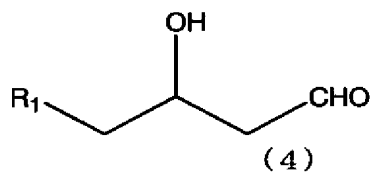
[化2]



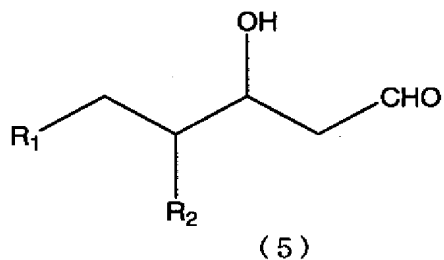
[化3]



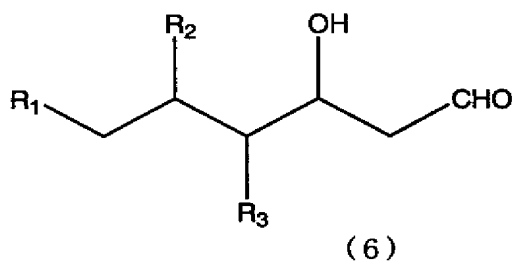
[化4]



[化5]



[化6]

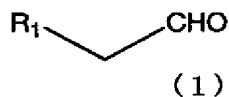


- [4] 一般式(1)、一般式(2)または一般式(3)で示される化合物に対し、アセトアルデヒドを0.5モル等量以上3.0モル等量以内の範囲で使用する、請求項3記載の製造方法。
- [5] 一般式(1)、一般式(2)または一般式(3)で示されるアルデヒド化合物とアセトアルデヒドの合計モル数に対し、D-2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼを0.1U/mmole以上80U/mmole以下の割合で用いて(1Uは、25℃で1分間当たり1 μmol

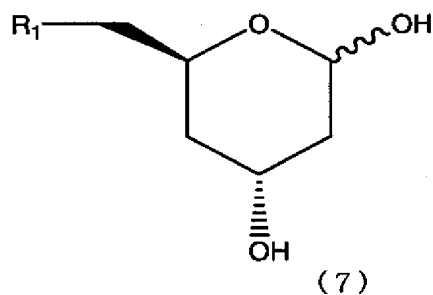
のD-2-デオキシリボース-5-リン酸をD-グリセルアルデヒド-3-リン酸とアセトアルデヒドに分解する酵素量を表す)反応させる、請求項4記載の製造方法。

- [6] 一般式(1)、一般式(2)または一般式(3)で示されるアルデヒド化合物が、アセトアルデヒド、クロロアセトアルデヒド、グリコールアルデヒド、プロピオンアルデヒド、ブチルアルデヒド、イソブチルアルデヒド、3, 4-ジヒドロキシブチルアルデヒド、マロン酸セミアルデヒド、コハク酸セミアルデヒド、アジピン酸セミアルデヒドから選ばれるアルデヒドである、請求項5記載の方法。
- [7] 100mMのクロロアセトアルデヒドを含有する水媒体中、25℃で30分間処理した後の残存活性が50%以上であるD-2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼ(または該酵素を含む細胞またはその処理物)の存在下、炭素数が2から6の置換または無置換の脂肪族アルデヒド化合物と2分子のアセトアルデヒドをアルドール縮合反応させる、炭素数が4増加したヒドロキシアルデヒド化合物の製造方法。
- [8] 請求項1記載のD-2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼが下記の(1)または(2)のものである、請求項7記載の製造方法。
- (1)配列番号1または配列番号2に示されたアミノ酸配列を有する。
- (2)配列番号1または配列番号2記載のアミノ酸配列の、1ないし数個のアミノ酸が欠失、または他のアミノ酸残基に置換され、或いは他のアミノ酸残基が挿入されたアミノ酸配列を有する。
- [9] 炭素数が2から6の置換または無置換の脂肪族アルデヒド化合物が一般式(1)で示される化合物であり、炭素数が4増加したヒドロキシアルデヒド化合物が一般式(7)で示される化合物である、請求項8記載の製造方法(一般式(7)中、R1は水素原子、水酸基、ハロゲン原子、アジド基、カルボキシル基または炭素数が1から4のアルコキシ基を示す。)

[化7]

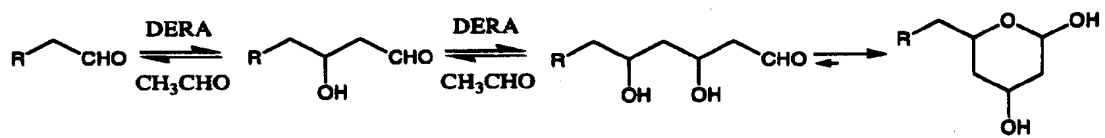


[化8]



- [10] 一般式(1)で示される化合物とアセトアルデヒドの合計モル数に対し、D-2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼを0.1U/mmole以上120U/mmole以下の割合で用いて(1Uは、25℃で1分間当たり1 μ molの該D-2-デオキシリボース-5-リン酸をD-グリセルアルデヒド-3-リン酸とアセトアルデヒドに分解する酵素量を表す)反応させる、請求項9記載の製造方法(一般式(7)中、R1は、水素原子、水酸基、ハロゲン原子、アジド基、カルボキシ基、または炭素数が1から4のアルコキシ基を示す。)
- [11] 一般式(1)で示される化合物が、アセトアルデヒド、クロロアセトアルデヒド、グリコールアルデヒド、プロピオンアルデヒド、ブチルアルデヒド、3,4-ジヒドロキシブチルアルデヒド、マロン酸セミアルデヒド、コハク酸セミアルデヒド、アジピン酸セミアルデヒドから選ばれるアルデヒドである請求項10記載の方法。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005719

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12P7/24, 19/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12P7/24, 19/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), CAPLUS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
SwissProt/PIR/Geneseq, PubMed, JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GIJSEN, Harrie J.M. et al., Unprecedented Asymmetric Aldol Reactions with Three Aldehyde Substrates Catalyzed by 2-Deoxyribose-5-phosphate Aldolase., Journal of the American Chemical Society. 1994, Vol.116, pages 8422 to 8423.	1-11
A	DEOXYRIBOSE-PHOSPHATE ALDOLASE (PHOSPHODEOXY RIBOALDOLASE) (DEOXYRIBOALDOLASE). [online]. 15 February, 2000 (15.02.00). NCBI Entrez Protein, ACCESSION Q9X1P5 [Retrieved on 15 June, 2005 (15.06.05)]. Retrieved from the internet: <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?7674000:OLD03:232480>	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
20 June, 2005 (20.06.05)

Date of mailing of the international search report
05 July, 2005 (05.07.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005719

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Probable deoxyribose-phosphate aldolase (Phosphodeoxyriboaldolase) (Deoxyriboaldolase). [online]. 15 June, 2002 (15.06.02). NCBI Entrez Protein, ACCESSION Q8ZXK7 [Retrieved on 15 June, 2005 (15.06.05)]. Retrieved from the internet: <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?24636804:OLD11:1906022>	1-11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. ⁷ C12P 7/24, 19/02		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. ⁷ C12P 7/24, 19/02		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)、CAplus (STN)、GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq、SwissProt/PIR/Geneseq、PubMed、JSTPlus (JOIS)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	GIJSEN, Harrie J. M., et al., Unprecedented Asymmetric Aldol Reactions with Three Aldehyde Substrates Catalyzed by 2-Deoxyribose-5-phosphate Aldolase., Journal of the American Chemical Society. 1994, Vol.116, pages 8422-8423.	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 20.06.2005	国際調査報告の発送日 05.07.2005	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 上條 肇 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 3535

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	DEOXYRIBOSE-PHOSPHATE ALDOLASE (PHOSPHODEOXYRIBOALDOLASE) (DEOXYRIBOALDOLASE). [online]. 15-FEB-2000. NCBI Entrez Protein, ACCESSION Q9X1P5[Retrieved on 2005-6-15]. Retrieved from the internet:<URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi ?7674000:OLD03:232480>	1-11
A	Probable deoxyribose-phosphate aldolase (Phosphodeoxyriboaldolase) (Deoxyriboaldolase). [online]. 15-JUN-2002. NCBI Entrez Protein, ACCESSION Q8ZXX7[Retrieved on 2005-6-15]. Retrieved from the internet:<URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi ?24636804:OLD11:1906022>	1-11